

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL BIOGUM XANTHAN DARI *BRASSICA OLERACEAE* ASAL KEPUNAN MAGELANG JAWA TENGAH

Mustini¹ & Erny Qurotul Ainy¹

¹Prodi Biologi, Fakultas Sains & Teknologi, UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
E-mail: qurotul.ainy@gmail.com

Abstract

Food additive such as gelling agent and emulsifier is essential ingredient in food processing. Microbial gum such as xanthan gum is a hydrocolloid microbial that could play as gelling agents and emulsifier in food industry. Xanthan gum is produced by a phytopathogenic bacteria, Xanthomonas campestris. This study aims to isolate xanthan gum producing local bacteria of Brassica oleracea L. leaf showing black root symptom. The isolation performed by inoculating leaf on nutrient agar media. Three isolated bacteria were purified and tested their ability in producing gum using YDC broth for 4 days. The test result showed that the isolates were Xh.A, Xh.B, and Xh.C had ability to produce biogum. Profile matching result showed that Xh.A, Xh.b, and Xh.C were identified as member of Pseudomonas, Aureobacterium and Xanthomonas genus, respectively.

Key words: *xanthan gum, phytopathogen bacteria, profile matching*

PENDAHULUAN

Biogum merupakan biopolimer yang biasa digunakan sebagai pengental dan penstabil emulsi yang banyak digunakan pada industri pangan, farmasi, kosmetik, tekstil, cat, kertas, dan perekat serta industri minyak dan gas (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000; Rosalam & England, 2006). Selama ini industri pengguna bahan pengental biasanya menggunakan biogum yang diekstrak dari tulang hewan babi. Isu penggunaan

biogum pada berbagai bidang industri mengkhawatirkan konsumen khususnya umat muslim. Perkembangan industri-industri yang memerlukan bahan pengental membuka kesempatan berkembangnya industri penghasil biogum mikroba sebagai alternatif pengganti biogum dari hewan babi untuk mendukung terwujudnya produk industri halal.

Biogum mikroba adalah polisakarida ekstraseluler yang dapat

diperoleh dari hasil fermentasi kultur mikroba (Pangestiningih, 1998). Dewasa ini dikenal biogum mikroba yang telah dikomersilkan dan digunakan pada berbagai industri antara lain gum alginat, gum gellan, gum pullulan dan gum xanthan (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000). Bakteri yang mampu menghasilkan biogum seperti *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, dan *Enterobacter* seringkali ditemukan sebagai bakteri patogen baik pada tanaman maupun pada manusia (Hardjanto, 1999).

Biogum yang dihasilkan merupakan senyawa penting bagi sel bakteri sebagai bentuk pertahanan terhadap kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan seperti dehidrasi, fagositosis, toksin dan biosida sehingga bakteri patogen mampu bertahan pada berbagai perubahan kondisi lingkungan.

Eksplorasi mikroba penghasil biogum telah banyak dilakukan di luar negeri, terutama di negara dengan mayoritas penduduknya adalah muslim (Jabeen *et al.*, 2012). Indonesia sebagai negara yang memiliki keanekaragaman hayati berpeluang besar untuk digali potensinya berupa mikroba penghasil biogum. Salah satu sumber isolat untuk eksplorasi mikroba penghasil biogum

adalah daun tanaman Kembang Kol (*Brassica oleracea* L.) yang mengalami gejala busuk hitam. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri penghasil biogum dari daun *B. oleracea* L di area pertanian Kapunan, Magelang, Jawa Tengah.

BAHAN DAN METODE

Sampel berupa daun *B. oleracea* L yang menguning dan mengalami gejala busuk hitam diperoleh dari sentra pertanian kubis dan kembang kol Desa Kapunan, Magelang, Jawa Tengah. Pengambilan sampel dilakukan menurut cara Streets (1972). Isolasi dilakukan dengan menggunakan cara Wilson *et al.* (1993 dalam Jabeen *et al.*, 2012). Potongan daun terinfeksi dicuci dengan aquades steril selama 5 menit kemudian direndam dalam larutan clorox 1% selama 1 menit. Selanjutnya sampel diinokulasikan di atas permukaan medium NA dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang 28°C. Koloni yang tumbuh dipurifikasi sebanyak 4 kali dengan cara menumbuhkan koloni isolat pada medium YDC dengan metode *streak plate* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C serta dilakukan pengecatan Gram. Isolat murni kemudian disimpan dalam agar miring

sebagai stok kultur murni untuk uji kemampuan menghasilkan biogum.

Penapisan awal isolat dilakukan untuk memilih bakteri penghasil biogum dengan cara uji *tactile* (Pangestinarsih, 1998). Isolat positif kemudian digunakan sebagai inokulum dalam proses fermentasi gum yang dilakukan dengan menginokulasikan 2% (v/v) kultur cair bakteri ke dalam 300 ml medium YDC *broth*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 hari. Setiap 24 jam sekali pertumbuhan sel bakteri diukur melalui pengukuran berat kering sel dan berat kering biogum yang dihasilkan (Jeeva *et al.*, 2011).

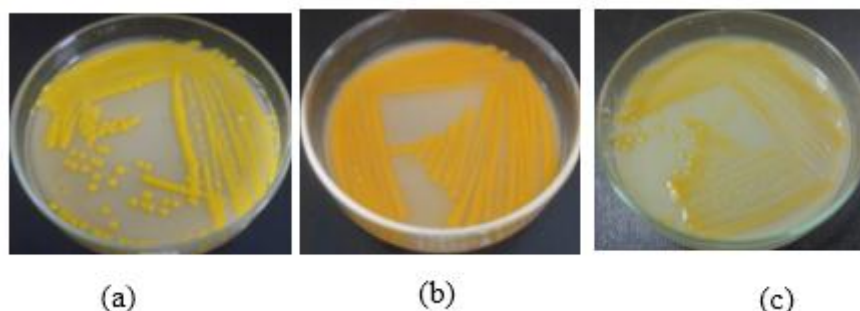
Isolat bakteri penghasil biogum diuji unit karakter fenotipiknya yang meliputi morfologi koloni dan sel, karakter biokimiawi dan fisiologis, serta uji resistensi terhadap antibiotik. Selanjutnya, isolat bakteri yang berpotensi menghasilkan biogum diidentifikasi hingga tingkat genus dengan metode *Profile Matching*.

Karakter fenotipik yang diperoleh disesuaikan dengan karakter kunci dari genus yang telah diketahui menggunakan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Bakteri dari Daun Kembang Kol (*Brassica oleracea* L.) yang Mengalami Gejala Busuk Hitam (*Black Rot*)

Isolasi bakteri pada sampel daun Kembang Kol yang mengalami gejala busuk hitam menghasilkan tiga koloni bakteri berbeda yang tumbuh di sekitar potongan daun. Selanjutnya dilakukan purifikasi untuk memperoleh kultur murni. Masing-masing isolat bakteri kemudian diberi kode Xh.A, Xh.B, dan Xh.C (Gambar 1).



Gambar 1. Isolat bakteri pada medium YDC agar (a) Xh.A; (b) Xh.B; (c) Xh.C

Uji Kemampuan Isolat Bakteri Menghasilkan Biogum dengan Fermentasi pada Medium YDC

Uji *tactile* menunjukkan bahwa ketiga isolat Xh.A, Xh.B, dan Xh.C memperlihatkan sifat mukoid (mulur) pada koloninya. Uji *tactile* dilakukan sebagai langkah awal untuk seleksi isolat yang memiliki kemampuan menghasilkan biogum. Berdasarkan hasil uji kemampuan menghasilkan biogum pada medium pertumbuhan YDC, ketiga isolat menunjukkan

produksi biogum dengan berat kering beragam (Tabel 1).

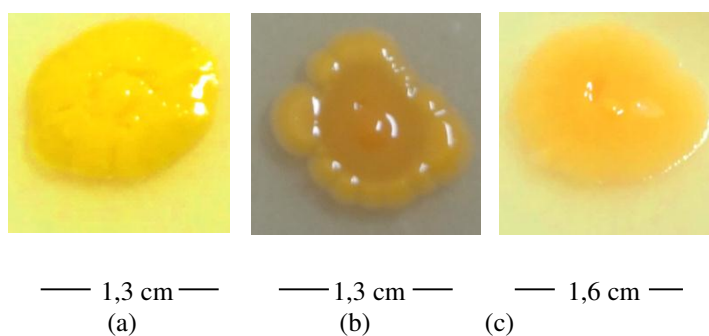
Karakterisasi Fenotipik Isolat

Bakteri Potensial Penghasil Biogum

Isolat Xh.A dan Xh.C memiliki warna hampir mirip berturut-turut berwarna kuning dan kuning krem, sedangkan koloni isolat Xh.B tampak berbeda dari keduanya, yakni berwarna oranye (Gambar 2). Karakter fenotip ketiga isolat ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil pengukuran berat kering sel dan berat kering biogum yang dihasilkan oleh isolat Xh.A, Xh.B dan Xh.C pada medium YDC setelah 4 hari fermentasi pada suhu 37°C

Fermentasi hari ke-	Berat kering sel (mg)			Berat kering biogum (mg)		
	Xh.A	Xh.B	Xh.C	Xh.A	Xh.B	Xh.C
1	3,7	3,0	1,3	7,2	8,8	1,0
2	0,4	0,7	1,9	0,7	1,2	0,8
3	3,7	8,0	5,8	1,7	0,8	1,6
4	5,0	7,0	7,0	1,0	1,0	15

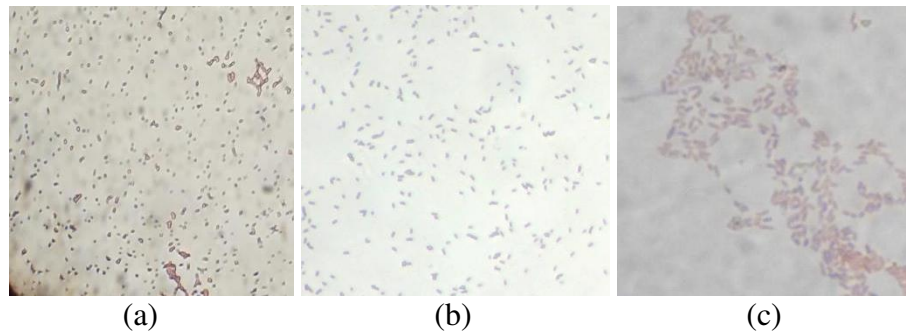


Gambar 2 Morfologi koloni dan ukuran diameter koloni pada medium YDC agar: (a) isolat Xh.A; (b) isolat Xh.B; (c) isolat Xh.C

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kusumaningrum *et al.* (2003) berhasil mengisolasi bakteri

Xanthomonas campestris pada sumber isolat berbeda, yakni tanaman Brokoli sakit dan Kubis busuk hitam. Koloni

isolat berwarna kuning atau putih kekuningan, dan permukaan luar rata berlendir, serta permukaan dalam halus.



Gambar 3. Hasil pengecatan Gram (Perbesaran 1000x) pada: (a) isolat Xh.A; (b) isolat Xh.B; (c) isolat Xh.C

Tabel 2. Hasil uji karakter fenotipik isolat bakteri penghasil biogum yang diisolasi dari daun Kembang Kol yang mengalami gejala busuk hitam.

Karakter yang diuji	Kode Isolat		
	Xh.A	Xh.B	Xh.C
Morfologi koloni:			
- Bentuk koloni	<i>Circular</i>	<i>Irregular</i>	<i>Irregular</i>
- Warna koloni	Kuning	Oranye	Kuning krem
- Elevasi	<i>Convex</i>	<i>Convex</i>	<i>Umbonate</i>
- Tepi koloni	<i>Entire</i>	<i>Undulate</i>	<i>Undulate</i>
- Permukaan koloni	Berlendir	Berlendir	Berlendir
- Permukaan dalam koloni	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>	<i>Smooth</i>
Morfologi Sel:			
- Cat Gram	-	+	-
- Bentuk sel	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
- Susunan sel	<i>Single</i>	<i>Single</i>	<i>Single</i>
- Endospora	-	-	-
- Motilitas	+	+	+
Biokimiawi:			
- Katalase	+	+	+
- H ₂ S	-	-	-
- Hidrolisis pati	-	-	-
- Hidrolisis lemak	+	+	+
- Hidrolisis kasein	-	+	-
- Kovac's oksidase/indol	-	-	+
- Hidrolisis gelatin	-	-	-
- Reduksi sitrat	+	+	+
- Reduksi nitrat	-	-	+
- Oksidase/fermentatif	-	-	+
- Fermentasi karbohidrat			
Penghasilan gas			
- Glukosa	-	-	-
- Maltosa	-	-	-
- Sukrosa	-	-	-
- Manitol	-	-	-
- Laktosa	-	-	-

- Dekstrosa	-	-	-
Penghasil asam			
- Glukosa	-	+	+
- Maltosa	+	+	-
- Sukrosa	+	+	-
- Manitol	+	+	+
- Laktosa	+	+	-
- Dekstrosa	+	+	-
Karakter Fisiologis			
- Suhu pertumbuhan			
-8°C	-	-	-
5°C	-	-	-
28°C	+	+	+
37°C	-	+	+
55°C	-	-	-
- pH pertumbuhan			
2	-	-	-
4	-	-	-
7	+	+	+
9	+	+	+
10	-	-	-
12	-	-	-
- Konsentrasi NaCl			
NaCl 1%	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+
NaCl 10%	-	-	-
- Kebutuhan O ₂	Aerob	Aerob	Aerob
Resistensi Antibiotik			
- Penisilin	R	S	R
- Kloramfenikol	S	S	R
S = sensitif terhadap antibiotik R = resisten terhadap antibiotik			

Identifikasi Tingkat Genus (*Generic Assignment*) dengan Metode *Profile Matching*

Berdasarkan hasil identifikasi tingkat genus (*generic assignment*) dengan metode *profile matching*, tiga isolat unggul penghasil biogum Xh.A, Xh.B, dan Xh.C masing-masing diduga kuat sebagai anggota genus *Pseudomonas*, *Aureobacterium* dan *Xanthomonas*. Anggota genus *Pseudomonas* dan *Xanthomonas* adalah bakteri Gram negatif, sedangkan *Aureobacterium* merupakan

bakteri Gram positif. Meskipun *Pseudomonas* dan *Xanthomonas* sama-sama Gram negatif, tetapi keduanya memiliki karakter pembeda yaitu *Xanthomonas* mampu mereduksi nitrat, sedangkan *Pseudomonas* tidak mampu mereduksi nitrat.

Dugaan bahwa isolat Xh.A adalah anggota genus *Pseudomonas* dikuatkan oleh Lapasin dan Sabrina (1995) yang melaporkan bahwa *Pseudomonas* mampu membentuk biogum berupa gellan. Hasil penelitian sebelumnya juga banyak menyebutkan

bahwa bakteri patogen yang sering menyerang famili Brassicaceae mampu menghasilkan eksopolisakarida berupa biogum, salah satunya berasal dari genus *Xanthomonas*. Pada penelitian ini isolat yang mengarah pada karakter kunci genus *Xanthomonas* adalah isolat Xh.C.

Isolat Xh.B memiliki karakter yang mirip dengan kelompok bakteri Gram positif dari genus *Aureobacterium*. Maka dapat dikatakan bahwa isolat lokal yang diperoleh dari hasil isolasi bakteri pada daun Kembang Kol yang mengalami gejala busuk hitam mampu menghasilkan biogum

Tabel 3. Hasil *profile matching* isolat bakteri penghasil biogum dengan beberapa genus yang telah diketahui

Karakter Kunci	<i>Pseudomonas</i>	Xh.A	<i>Aureobacterium</i>	Xh.B	<i>Xanthomonas</i>	Xh.C
Warna koloni	NA	NA	Kuning/Oranye	Oranye	Kuning	Kuning krem
Permukaan koloni	NA	NA	NA	NA	Halus	Halus
Sifat koloni	NA	NA	NA	NA	Lengket	Lengket
Bentuk sel	Batang lurus/melengkung	Batang lurus	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek	Batang pendek
Sifat Gram	-	-	+	+	-	-
Susunan sel	NA	NA	Tunggal	Tunggal	Tunggal	Tunggal
Motilitas	+	+	+/-	+	+	+
Endospora	NA	NA	-	-	NA	NA
Katalase	+	+	+	+	+	+
Oksidase Sitokrom	+/-	-	NA	NA	+/-	+
Reduksi Nitrat	+/-	-	NA	NA	+	+
Penghasil Gas dari:						
- Glukosa	NA	NA	-	-	NA	NA
- Maltosa	NA	NA	-	-	NA	NA
- Sukrosa	NA	NA	-	-	NA	NA
- Manitol	NA	NA	-	-	NA	NA
- Laktosa	NA	NA	-	-	NA	NA
- Dekstrosa	NA	NA	-	-	NA	NA
Penghasil Asam dari:						
- Glukosa	NA	NA	+	+	NA	NA
- Maltosa	NA	NA	+	+	NA	NA
- Sukrosa	NA	NA	+	+	NA	NA
- Manitol	NA	NA	+	+	NA	NA
- Laktosa	NA	NA	+	+	NA	NA
- Dekstrosa	NA	NA	+	+	NA	NA
Suhu pertumbuhan 25 - 30°C	NA	NA	+	+	+	+
Kebutuhan O ₂	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob	Aerob

NA: Not Applicable

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dari daun Kembang Kol yang mengalami gejala busuk hitam di area pertanian Kapunan, Magelang, Jawa Tengah diperoleh tiga

isolat bakteri potensial penghasil biogum yakni isolat Xh.A, Xh.B, dan Xh.C. Ketiga isolat lokal tersebut mampu menghasilkan biogum pada medium pertumbuhan YDC *broth*. Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan *profile*

matching, ketiga isolat potensial penghasil biogum Xh.A, Xh.B dan Xh.C berturut-turut merupakan anggota genus *Pseudomonas*, *Aureobacterium* dan *Xanthomonas*.

DAFTAR PUSTAKA

- Carignatto, C.R.R., Kassandra, S.M.O., Valéria, M.G.D.L., & Pedro, D.O.N. (2011). New culture medium to xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian J Microbiol*, 51, 283 – 288.
- Garcia-Ochoa, F. , Santos, V.E., Casas, JA., Gomez, E. (2000). Xanthan Gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnology Advances*. Elsevier Science Inc., 549-579.
- Hardjanto, D. (1999). Pengaruh nutrisi dan lama fermentasi terhadap produksi biogum dari *Enterobacter* sp. dan *Erwinia* sp. [Skripsi]. Bogor: IPB.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. dan Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore
- Jabeen, R., Tehreema, I. dan Huma, B.(2012). Isolation, characteriization, preservation and phatooogenicity test of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing BLB disease and rice. *Pak. J. Bot.*, 44, 261 – 265.
- Jeeva, S., T.S. Mohan, A. Palavesam, N.C.J.P. Lekshmi, dan J.R. Brindha. (2011). Production and optimization study of a novel extracellular polysaccharide by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 1, 175 – 182.
- Kusumaningrum, G.S. Suranto & Ratna,. S. (2002). Aktivitas penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji pala (*Myristica fragrans* Houtt dan *Myristica fattua* Houtt) terhadap pertumbuhan bakteri *Xanthomonas campestris* Oammel asal tanaman brokoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Biofarmasi*, 1, 20-24.
- Lapasin, R. dan Sabrina, P.(1995). *Rheology of industrial polysaccharides theory and applications*. London: Blackie Academic and Professional.
- Pangestiningih. (1998). Isolasi dan seleksi mikroba penghasil gum dari sayuran busuk, lendir pada tempat pembuatan tahu, dan daun. [Skripsi]. Bogor: IPB.
- Rosalam, S. dan England, R.(2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. *Enzym Microbiol Tecol*, 39, 197 – 207.
- Streets, R.B. (1972). *Diagnosis of plant diseases*. USA: The University of Arizona Press.